

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-136972

(P 2 0 0 1 - 1 3 6 9 7 2 A)

(43) 公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
C12N 15/09	ZNA	C08G 59/14	2G045
C08G 59/14		C12Q 1/68	A 4B024
C12Q 1/68		G01N 33/50	P 4B063
G01N 33/50		C12N 15/00	ZNA A 4J036

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-324194

(22) 出願日 平成11年11月15日 (1999.11.15)

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社
東京都港区港南一丁目 6 番41号

(72) 発明者 藤井 渉

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番 1 号 三
菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

(72) 発明者 浦垣 俊孝

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番 1 号 三
菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

(72) 発明者 渡辺 文昭

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番 1 号 三
菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸固定化高分子ゲル及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 核酸固定化高分子ゲル及びその製造法の提供。

【解決手段】 高分子表面及びその内部にグリシジル基を介して核酸を固定化し、過剰のグリシジル基を多価アミンで架橋することによって、核酸を効率的に強固に高分子ゲルに固定化でき、さらにこのゲルを用いて検体中の核酸を安定に、しかも高感度で検出できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む核酸固定化高分子ゲル。

【請求項2】 重合性モノマー成分の少なくとも1種類が、グリシジル基を有する重合性モノマーである請求項1記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項3】 グリシジル基を有する重合性モノマーがグリシジル(メタ)アクリレートである請求項2記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項4】 核酸成分が、末端アミノ化された核酸である請求項1～3いずれか1項記載の核酸固定化高分子ゲル。

【請求項5】 核酸成分、多価アミン成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合することを特徴とする請求項1～4いずれか1項記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【請求項6】 核酸成分及び少なくとも2種類以上の重合性モノマー成分を含む溶液を重合した後、該ポリマーを多価アミン成分により架橋した請求項1～4いずれか1項記載の核酸固定化高分子ゲルの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、核酸固定化高分子ゲル及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができる。その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限があるが、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一遺伝子レベルという極めて多数の遺伝子の総合的・系統的解析を行うために、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法(DNAチップ法)と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発されてきた。

【0003】 本発明者らの一部は、先にマイクロアレイの新規な製造法を開発し、出願している。(特願平11-84100号明細書参照) 該発明は、核酸固定化ゲルをその中に保持する核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を作製し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより薄片を得るものである。この薄片は固定化核酸

二次元高密度配列体、すなわちマイクロアレイである。

【0004】 核酸をゲルに固定化する試みはなされており、例えば、ヒドロキシスクシンイミドを脱離基としてもつ共重合体ゲルにアミノ化DNAを固定化する方法(Polym. Gel. Netw., 4, (2), 111 (1996))、アルデヒド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法(Nucleic Acid Res., 24, 3142 (1996))、メシル基を導入したポリアクリルアミドゲルにアミノ化DNAを結合させる方法(ibid.)、ヒドラジド基を導入したポリアクリルアミドゲルにアルデヒド化したDNAを結合させる方法(Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 4913 (1996))等が知られている。しかしながら、操作性と実用性の問題から、より優れた方法が求められていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、操作性と実用性の改良された核酸固定化高分子ゲル及びその製造法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の問題点を解決するために鋭意検討した結果、高分子ゲル表面及びその内部にグリシジル基を介して核酸を固定化し、過剰のグリシジル基を多価アミンで架橋することによって、核酸を効率的に強固に高分子ゲルに固定化でき、さらにこのゲルを用いて検体中の核酸を安定に、しかも高感度で検出できることを見出し本発明に到達した。

【0007】 すなわち、本発明は、核酸が高分子ゲル表面及びその内部に結合、固定化された、核酸固定化高分子ゲルの製造法に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】 本発明において、ゲルに固定化する対象となる核酸としては、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)が挙げられる。本発明に用いる核酸は、市販品又は生細胞等から得られた核酸でもよい。

【0009】 生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法(Nucleic Acids Res. 3, 2303 (1976))等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法(Methods. Enzymol. 65, 718 (1980))等により行うことができる。

【0010】 固定化する核酸としては、鎖状若しくは環状のプラスミドDNA又は染色体DNAが用いられる。これらのDNAは、制限酵素若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等でも構わない。

【0011】 本発明に用いることができる重合性モノマ

一或多価アミンの種類は特に制限されない。グリシジル基を有する重合性モノマーとしては、例えばグリシジル(メタ)アクリレート等が挙げられる。他の重合性モノマーとしては、例えばアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリル酸、アリルデキストリン等が挙げられる。多価アミンとしては、例えばエチレンジアミン、ジアミノプロパン、ジアミノブタン、ジアミノペンタン、ヘキサメチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレントトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、ジエチルアミノプロピルアミン等が挙げられる。

【0012】核酸をグリシジル基を介して共有結合によりゲルに固定化する場合、あらかじめ核酸を修飾しておく必要がある。修飾に際しては、グリシジル基と反応するものであれば特に制限を受けない。例えば、アミノ基が導入されたものを用いることができる。

【0013】以下、核酸へのアミノ基の導入法に関して説明する。アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は、特に限定されるものではなく、核酸の5'末端又は3'末端のみならず核酸の鎖中、例えば、リン酸ジエステル結合部位又は塩基部位であってもよい。

【0014】この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等明細書記載の方法に従い調製することができる。

【0015】これらの方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬、例えば、アミノリンクII(PEバイオシステムズジャパン社製)、Amino Modifiers(クロンテック社製)などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸に、アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法(Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))に従い調製することができる。

【0016】核酸の高分子ゲルへの固定化は、高分子ゲルと核酸を混合することによって行うことができる。反応率あるいは反応速度を考慮し、塩基などの触媒を用いることも可能である。

【0017】固定化温度は、0~100℃が好ましく、さらには、20~80℃が好ましい。

【0018】核酸固定化高分子ゲルは、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する核酸の検出に用いることができる。

【0019】本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核

酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化高分子ゲルを検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。また、広義には、検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる核酸を指す。

【0020】したがって、核酸固定化高分子ゲルは、固定化された核酸(プローブ)とハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に限定されず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料、例えば生体成分等を検出するために利用することも可能である。

【0021】固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸、タンパク質又は低分子化合物等に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0023】実施例1

(1) 5'末端にアミノ基を有するオリゴヌクレオチドの作製

以下に示したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)を合成した。

プローブA: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (配列番号1)

プローブB: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (配列番号2)

【0024】オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成機DNA/RNA synthesizer(model 394)(PEバイオシステムズ社製)を用いて行い、DNA合成の最終ステップで、アミノリンクII(アブライドバイオシステム社製)を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₂-を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

【0025】(2)核酸固定化高分子ゲルの作製

(1)で得られたプローブA又はB(500nmol/ml)5μl、及びグリシジルメタクリレート5μlを混合し、70℃で2時間反応させた。そこへ50%アクリルアミド水溶液50μl、1.0%エチレンジアミン水溶液10μlおよび水450μl、1.0%のアゾ

ビスイソブチロニトリル水溶液 5 μ lを加え、70℃で2時間重合反応を行い、核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは、5mmの厚さに切り出し、検出操作を行った。

【0026】(3) 試料核酸の標識

試料核酸のモデルとして、(1)で作製したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)の配列の一部に補助的なオリゴヌクレオチド(C、D)を合成した。

オリゴヌクレオチド C: GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (配列番号3)

オリゴヌクレオチド D: CTGCTGTCCCAAA CCCTGACCTCCACC (配列番号4)

【0027】これらのオリゴヌクレオチドの5'末端に、(1)と同様にしてアミノリンクII(PEバイオシステムズジャパン社製)を用いて、NH₂(CH₂)₆を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン(DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で標識した。

【0028】末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドを、それぞれ終濃度2mMとなるように100mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に溶解した。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (26mg/ml ジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

【0029】容量を100 μ lに調整し、2 μ lのグリコーゲン(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)、10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、300 μ lの冷エタノールを加え、15,000rpm、15分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。さらに、沈殿に500 μ lの70%エタノールを加え、15,000rpm 5分間、遠心分離を行い、沈殿を回収した。沈殿を風乾し、100 μ lの10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTAに溶解した。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0030】(4) ハイブリダイゼーション

(2)で作製した核酸固定化高分子ゲル切片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、表1の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間、プレハイブリダイゼーションを行い、(3)で得られたDIG標識DNAを加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

(ハイブリダイゼーション溶液組成)

5XSSC

5% ブロッキング試薬(DIG Detectionキット中の試薬)

0.01% N-ラウロイルザルコシンナトリウム

0.02% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

50% ホルムアミド

【0031】(5) 検出

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化高分子ゲル切片を、あらかじめ保温しておいた50mlの0.1XSSC、0.1%SDS溶液に移し、振盪しながら45℃、20分間、洗浄を3回行った。

【0032】次に、DIG緩衝液1(0.1M マレイン酸、0.15M 塩化ナトリウム(pH7.5))を加え、室温で振盪しながらSDSの除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG緩衝液2(DIG緩衝液に0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの)を加え1時間振盪した。緩衝液を除いた後、10⁻⁴量の抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体(DIG Detectionキットの試薬)を含むDIG緩衝液2 10mlを加え、30分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に0.2%Tween 20を含むDIG緩衝液1で15分間、2回振盪することにより洗浄し、引き続きDIG緩衝液3(0.1M トリス-塩酸(pH9.5)、0.1M 塩化ナトリウム、0.05M 塩化マグネシウム)に3分間浸した。DIG緩衝液3を除いた後、CDP-Star(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を含むDIG緩衝液3 mlを加えた。

【0033】水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。

【0034】その結果、プローブAのゲル切片には、オリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBのゲル切片には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

【0035】実施例2

(1) グリシジル基含有高分子ゲルの作成

アクリルアミド 4.88重量部、エチレンジアミン 0.02重量部、グリシジルメタクリレート 0.1重量部からなる水溶液にアソビスイソブチロニトリルを0.1%濃度になるように加え、70℃で2時間反応させ、高分子ゲルを作成した。

【0036】(2) 核酸高分子ゲルの作製

高分子ゲルを10mm角の厚さに切り出し、実施例1

(1)の方法で作製したプローブA又はB(500nmol/ml)100 μ lを混合し、70℃で2時間反応させ、核酸固定化高分子ゲルを作製した。また、プローブBについても同様に操作を行い核酸固定化高分子ゲルを作製した。作製した核酸固定化高分子ゲルは5mmの厚さに切り出し、実施例1の(3)~(5)と同様の操作で検出を行った。

【0037】その結果、プローブAのゲル切片にはオリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBのゲル切片にはオリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば、核酸を効率的にかつ強固に固定化させた核酸固定化ゲルを得ることができ、また、この材料を用いて検体中の核酸を検出する際、洗浄

操作中などに生じる核酸の脱離に伴う感度の低下などの問題点を克服することができる。

【0039】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> Nucleic acid-fixed polymer and the method of production

<130> P110582000

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

cgcatcgaaa ccttgcctgta cgagcgaggg ctc

33

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag

32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctgctgtccc aaacctgac ctccacc

27

【0040】

【配列表のフリーテキスト】配列番号1：合成DNA
配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

フロントページの続き

(72)発明者 湯 不二夫
神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三
菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB10 BB14 BB29 BB51
DA12 FB01 FB02 FB03 FB09
4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11
HA13 HA14
4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ52 QR32
QR35 QR38 QR55 QR84 QS28
QS35 QS39 QX02
4J036 AK11 FB06 JA15